

食品中 β -環狀糊精之檢驗方法開發

洪于鈞 林巧欣 方俊仁 詹怡軒 許哲綸
林雅姿 黃守潔 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

β -環狀糊精(β -Cyclodextrin)係由6個吡喃葡萄糖分子所組成之環狀寡糖，其特殊結構可增加客體分子的穩定性、溶解度、保存期限和顏色穩定性等功用，在食品工業、製藥和生物技術中被廣泛應用。本研究建立以液相層析串聯質譜法(Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)分析食品中 β -環狀糊精之檢驗方法，以速食麵、薯片、調味飲料及口香糖為測試基質，進行專一性、線性及基質效應、定量極限、準確度及重複性之評估。結果顯示，上述4種基質皆無干擾待測物之現象；所得之基質效應介於-25至-64%，具有訊號抑制之基質效應；其基質匹配檢量線於1 - 20 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度範圍內線性程度皆良好；平均回收率介於90.3 - 103.5%之間，變異係數介於0.8 - 5.9%之間，本檢驗方法之定量極限，於速食麵、調味飲料及以薯(蓆)類、麵粉或澱粉為原料之零食為0.1 g/kg，於口香糖為0.5 g/kg。再將本分析方法應用於市售產品，包括零食、調味飲料、口香糖等共計20件檢體，驗證所建立之檢驗方法適用性，結果均未檢出 β -環狀糊精。

關鍵詞：液相層析串聯質譜法、 β -環狀糊精、速食麵、薯片、飲料、口香糖

前 言

環狀糊精(Cyclodextrins, CDs)是藉由葡萄糖基轉移酶(Glucosyltransferase)降解澱粉，以 α -1,4-糖苷鍵連結吡喃葡萄糖分子所形成的環狀寡糖之總稱。天然的CDs是由至少6個吡喃葡萄糖分子所組成，依組成數量可分為6個的 α -環狀糊精(α -Cyclodextrin)、7個的 β -環狀糊精(β -Cyclodextrin)和8個的 γ -環狀糊精(γ -Cyclodextrin)⁽¹⁾。由於CDs的特殊結構，可增加客體分子(Guest Molecules)的穩定性、溶解度、保存期限和顏色穩定性等功用，在食品工業、製藥和生物技術中被廣泛應用，其

中 β -環狀糊精已被應用於食品工業，是製備內含物最常用的宿主(Host)⁽²⁾，其為白色或接近白色之結晶固體，現為我國可供食品使用之原料，可作為食品加工之安定、粘稠的用途。衛生福利部108年6月11日第二次預告修正之「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」草案⁽³⁾中， β -環狀糊精為該草案附表一所列第(七)類之品質改良用、釀造及食品製造用劑、第(十二)類之粘稠劑(糊料)及第(十五)類之載體，可使用於口香糖及泡泡糖中，用量為20 g/kg以下；於速食麵中，用量為1.0 g/kg以下；於調味飲料中，用量為0.50 g/kg以下；於以薯(蓆)類、麵粉或澱粉為原料之零食中，用

量為0.50 g/kg以下。 β -環狀糊精之分析方法有紫外/可見光譜(Ultraviolet/Visible Spectroscopy, UV-vis Spectroscopy)、核磁共振光譜(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)、螢光(Fluorescence)、圓偏光二色性(Circular Dichroism)、高效液相層析或質譜等分析方法⁽²⁾。由於修正草案中 β -環狀糊精使用範圍僅限於速食麵、調味飲料、以薯(藷)類、麵粉或澱粉為原料之零食、口香糖及泡泡糖中，本研究參考Sforza等⁽⁴⁾於氯化鈉存在下將 β -環狀糊精以ESI正離子模式離子化，及Kinalakar等⁽⁵⁾使用水及乙腈作為移動相溶液，開發以液相層析串聯質譜儀分析速食麵、薯片、調味飲料及口香糖中 β -環狀糊精含量之檢驗方法，並依據衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽⁶⁾進行方法確效，另價購20件市售檢體利用所建立之方法檢測 β -環狀糊精，以確認此方法之適用性。

材料與方法

一、材料與方法

(一)檢體來源

自臺北地區大賣場線上購物，購入速食麵5件、調味飲料5件、以薯(藷)類、麵粉或澱粉為原料之零食5件及口香糖5件，共計20件檢體。

(二)試藥及對照用標準品

乙腈為液相層析級，購自J.T.Baker公司(Phillipsburg, NJ, USA)；乙醇(95%)及氯化鈉均為試藥特級，分別購自宸鼎生物科技股份有限公司(苗栗，臺灣)及Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)；去離子水(比電阻於25℃可達18 M Ω ·cm以上)； β -環狀糊精(β -cyclodextrin)對照用標準品，購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)。

(三)器具及材料

1 mL、25 mL、100 mL及1,000 mL容量瓶(玻璃材質)；濾膜(0.22 μ m，PVDF材質)；層析管(BEH Amide，1.7 μ m，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm)，購自Waters公司(Milford, MA, USA)。

(四)儀器及裝置

1. 超高效液相層析串聯質譜儀：1290 Infinity II LC Systems，6460A Triple Quadrupole LC/MS，Agilent公司(Santa Clara, CA, USA)。
2. 超音波振盪器：ELMASONIC P 120 H，Elma Schmidbauer公司(Singen, Germany)。

二、檢驗方法

(一)萃取溶液之調製

取氯化鈉0.5 g及乙醇500 mL，加去離子水溶解使成1,000 mL。

(二)移動相溶液之調製

1. 移動相溶液A：取氯化鈉10 mg，加去離子水溶解使成1,000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
2. 移動相溶液B：乙腈。

(三)標準溶液之配製

取 β -環狀糊精對照用標準品約100 mg，精確稱定，以萃取溶液溶解並定容至100 mL，供作標準原液，冷凍儲存。臨用時取適量標準原液，以萃取溶液稀釋至100 μ g/mL，供作標準溶液。

(四)檢液之調製

1. 速食麵、零食^(註)及調味飲料檢體

將檢體均質或混勻後，取約1 g，精確稱定，加入萃取溶液20 mL，超音波振盪15分鐘，以萃取溶液定容至25 mL，經濾膜過濾，供作檢液原液。取檢液原液500 μ L (a)，以萃取溶液定容至1,000 μ L (b)，供作檢液。

註：以薯(藷)類、麵粉或澱粉為原料之

零食。

2. 口香糖檢體

將檢體均質成粉狀，取約0.2 g，精確稱定，加入萃取溶液20 mL，超音波振盪15分鐘，以萃取溶液定容至25 mL，經濾膜過濾，供作檢液原液。取檢液原液500 μ L (a)，以萃取溶液定容至1,000 μ L (b)，供作檢液。

(五)基質匹配檢量線之製作

取空白檢體，依二、(四)調製空白檢液原液，分別量取500 μ L (a)，加入標準溶液10-200 μ L及萃取溶液定容至1,000 μ L (b)，混合均勻，供作基質匹配檢量線溶液，依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就 β -環狀糊精之波峰面積，與對應之 β -環狀糊精濃度，製作成1-20 μ g/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜分析條件：

層析管：BEH Amide，1.7 μ m，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 $\rightarrow$ 0.5	10 $\rightarrow$ 10	90 $\rightarrow$ 90
0.5 $\rightarrow$ 3.0	10 $\rightarrow$ 50	90 $\rightarrow$ 50
3.0 $\rightarrow$ 8.0	50 $\rightarrow$ 50	50 $\rightarrow$ 50
8.0 $\rightarrow$ 9.0	50 $\rightarrow$ 10	50 $\rightarrow$ 90
9.0 $\rightarrow$ 14.0	10 $\rightarrow$ 10	90 $\rightarrow$ 90

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 μ L。

離子化模式：ESI正離子。

毛細管電壓(Capillary Voltage)：3.5 kV。

噴嘴電壓(Nozzle Voltage)：2 kV。

乾燥氣溫度(Gas Temperature)：300 $^{\circ}$ C。

乾燥氣流量(Gas Flow)：12 L/min。

霧化氣體壓力(Nebulizer Gas Pressure)：45 psi。

鞘氣溫度(Sheath Gas Temperature)：

表一、超高效液相層析串聯式質譜儀之多重反應偵測模式參數

分析物	離子對	碎裂電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
β -環狀糊精	1,157.9 > 509.4	350	94
	1,157.9 > 347 ^a	350	98

^a 定量離子對

350 $^{\circ}$ C。

鞘氣流量(Sheath Gas Flow)：12 L/min。

偵測模式：多重反應偵測(Multiple Reaction Monitoring, MRM)。偵測離子對、碎裂電壓(Fragmentor Potential)與碰撞能量(Collision Energy)如表一所示。

(六)鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各10 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依二、(五)條件進行分析，就檢液及基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測之相對離子強度鑑別之，並依下列計算式求出檢體中 β -環狀糊精之含量(g/kg)：

檢體中 β -環狀糊精之含量(g/kg) =

$$\frac{C \times V \times F}{M \times 1,000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中 β -環狀糊精之濃度(μ g/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由b/a求得

三、檢驗方法確效

(一)專一性之評估

分別取市售速食麵、薯片、調味飲料及口香糖檢體，依二、(四)及(六)操作，評估檢體中是否存在有干擾待測物之現象。

(二)線性與基質效應之評估

為評估本檢驗方法之基質效應及線性，分別製作標準曲線及基質匹配檢量線，並計算基質效應。取適量標準溶液，以萃取溶液稀釋至1、2、4、6、8、10、15及20 $\mu\text{g/mL}$ ，依二、(五)條件進行分析，就 β -環狀糊精之波峰面積與對應之 β -環狀糊精濃度，製作標準曲線。另取市售速食麵、薯片、調味飲料及口香糖空白檢體，依二、(四)調製空白檢液原液，分別量取空白檢液原液500 μL ，加入標準溶液10、20、40、60、80、100、150及200 μL ，以萃取溶液定容至1,000 μL ，供作基質匹配檢量線溶液，再依二、(五)進行分析，就 β -環狀糊精之波峰面積與對應之 β -環狀糊精濃度，製作基質匹配檢量線。就前述所得標準曲線及基質匹配檢量線之斜率，依下列計算式求得基質效應。

基質效應(%) =

$$\left[\left(\frac{\text{基質匹配量線之斜率}}{\text{標準曲線之斜率}} \right) - 1 \right] \times 100$$

(三) 定量極限之評估

為評估本檢驗方法之定量極限，除計算層析圖譜中分析物波峰之訊號/雜訊比(Signal-to-Noise ratio, S/N ratio)，並執行回收率試驗。分別取市售速食麵、薯片、調味飲料空白檢體1 g及口香糖空白檢體0.2 g，添加標準原液0.1 mL，使其中 β -環狀糊精含量分別為0.1及0.5 g/kg，依二、(四)及(六)操作，進行5重複分析，測定檢體中 β -環狀糊精之含量並計算所得之平均回收率及變異係數。

(四) 準確度之評估

分別取市售速食麵、薯片、調味飲料空白檢體1 g，添加標準原液0.1及0.5 mL，使其中 β -環狀糊精含量分別為0.1及0.5 g/kg，另取口香糖空白檢體0.2 g，添加標準原液0.1及0.5 mL，使其中 β -環狀糊精含量分別為0.5及2.5 g/kg，依二、(四)及(六)操

作，進行5重複分析，測定檢體中 β -環狀糊精之含量並計算所得之平均回收率，以評估本檢驗方法之準確度。

(五) 重複性之評估

分別取市售速食麵、薯片、調味飲料空白檢體1 g，添加標準原液0.1及0.5 mL，使其中 β -環狀糊精含量分別為0.1及0.5 g/kg，另取口香糖空白檢體0.2 g，添加標準原液0.1及0.5 mL，使其中 β -環狀糊精含量分別為0.5及2.5 g/kg，依二、(四)及(六)操作，進行5重複分析，測定檢體中 β -環狀糊精之含量並計算所得之變異係數，以評估本檢驗方法之重複性。

四、市售產品適用性之評估

自行價購市售檢體，並依二、(四)至(六)操作，測定檢體中 β -環狀糊精，以評估本檢驗方法之適用性。

結 果

一、分析條件之建立

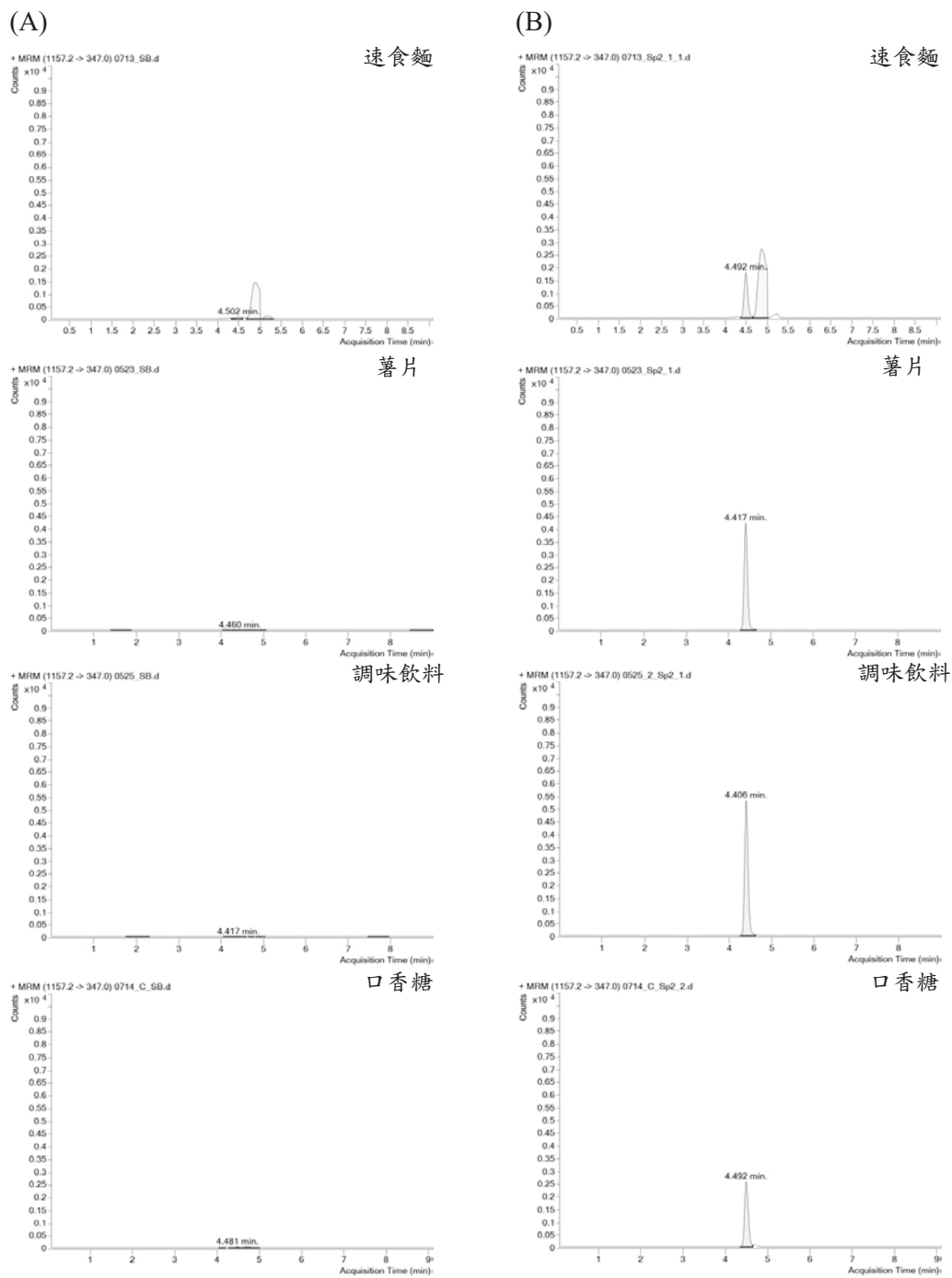
本研究利用液相層析串聯式質譜儀建立速食麵、薯片、調味飲料及口香糖食品等基質中 β -環狀糊精之分析方法，分析條件之評估係參考相關文獻^(4,5)並進行修改，建立 β -環狀糊精之質譜參數如表一所示。

二、專一性之評估

分別取市售速食麵、薯片、調味飲料及口香糖檢體，依二、(四)及(六)操作，結果顯示所得檢液之MRM層析圖譜皆無干擾待測物之現象(圖一)。

三、線性及基質效應之評估

依三、(二)製作標準曲線及4種不同基質之基質匹配檢量線(1-20 $\mu\text{g/mL}$)，所得線性回歸方程式及判定係數(R^2)如表二所示，計算4種不



圖一、專一性及定量極限之評估結果

(A)空白基質及(B)空白基質添加0.1 g/kg (速食麵、薯片、調味飲料)及0.5 g/kg (口香糖) β -環狀糊精之MRM層析圖譜

表二、線性及基質效應之評估結果

基質	濃度範圍($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式 ^a	判定係數(R^2)	基質效應(%)
溶劑	1-20	$y = 17,831x - 574.02$	0.9988	-
速食麵	1-20	$y = 6,479x - 1,711.5$	0.9987	-64
薯片	1-20	$y = 12,166x + 34.6$	0.9999	-32
調味飲料	1-20	$y = 13,366x + 4,108.4$	0.9993	-25
口香糖	1-20	$y = 10,688x - 5,945.3$	0.9979	-40

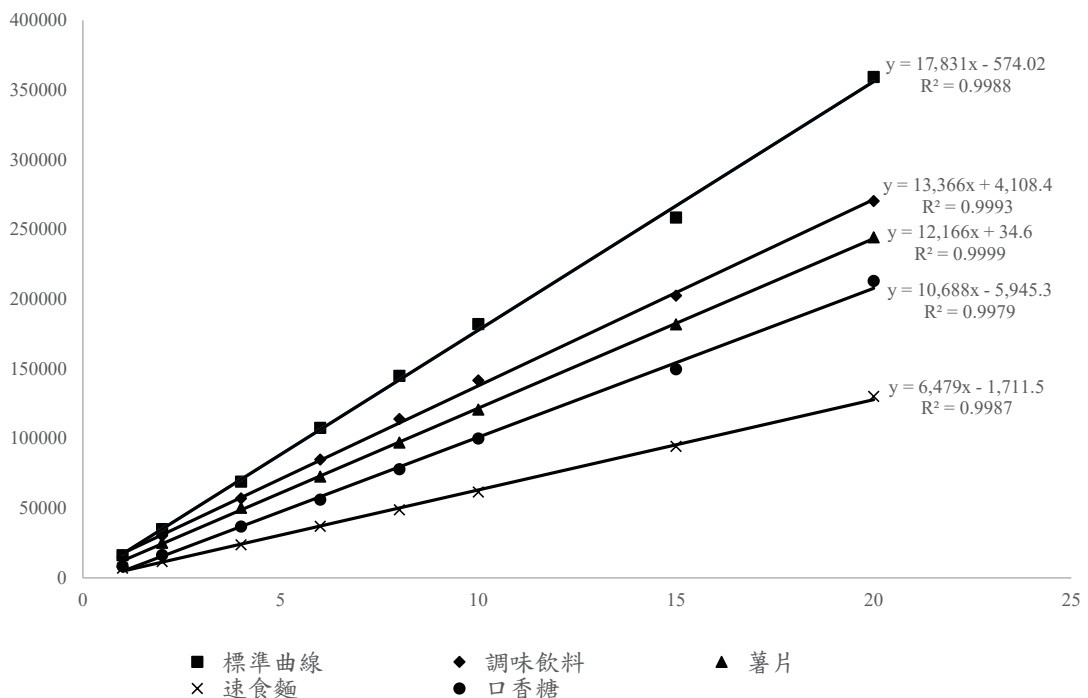
^a 以 β -環狀糊精波峰面積(y)與所對應之 β -環狀糊精濃度(x)進行線性回歸

同基質所得之基質效應介於-25至-64%，其為負值且數值皆高於20%，顯示具有訊號抑制之基質效應^(7,8)，又4種基質匹配檢量線之相關係數皆大於0.99 (圖二及表二)，顯示不同基質於此濃度範圍內之線性程度皆良好，爰本檢驗方法後續即以基質匹配檢量線進行定量。

四、定量極限之評估

分別取市售速食麵、薯片及調味飲料空白

檢體添加 β -環狀糊精0.1 g/kg，平均回收率介於93.6 - 103.5%，變異係數介於0.8 - 4.0% (n = 5)；口香糖空白檢體添加 β -環狀糊精0.5 g/kg，平均回收率為102.6%，變異係數為2.0% (n = 5)。兩者回收率及重複性(表三)皆符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範，爰本檢驗方法之定量極限分別定為0.1 g/kg (速食麵、薯片及調味飲料)及0.5 g/kg (口香糖)。



圖二、基質效應之評估

表三、定量極限、準確度及重複性之評估結果

基質	添加濃度 (g/kg)	平均回收率 (%) ^a	變異係數 (%) ^a
速食麵	0.1 ^b	103.5	4.0
	0.5	96.7	5.9
薯片	0.1 ^b	93.6	3.9
	0.5	95.2	2.3
調味飲料	0.1 ^b	97.1	0.8
	0.5	101.8	1.4
口香糖	0.5 ^b	102.6	2.0
	2.5	90.3	2.2

^a 5重複試驗(n=5)^b 本檢驗方法之定量極限

五、準確度及重複性之評估

分別取市售速食麵、薯片及調味飲料空白檢體添加 β -環狀糊精0.1及0.5 g/kg；口香糖空白檢體，添加 β -環狀糊精0.5及2.5 g/kg，依二、(四)及(六)操作，進行5重複分析，測定檢體中 β -環狀糊精之含量並計算所得之平均回收率及變異係數，如表三所示。

結果顯示，當添加 β -環狀糊精0.1及0.5 g/kg時，在速食麵基質中，平均回收率分別為103.5%及96.7%，變異係數為4.0%及5.9%；在薯片基質中，平均回收率分別為93.6%及95.2%，變異係數為3.9%及2.3%；在調味飲料基質中，平均回收率分別為97.1%及101.8%，變異係數為0.8%及1.4%。當添加 β -環狀糊精0.5及2.5 g/kg時，在口香糖基質中，平均回收率分別為102.6%及90.3%，變異係數為2.0%及2.2%，皆符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範，顯示本檢驗方法具有良好之準確度及重複性。

六、市售產品適用性之評估

為了解本檢驗方法應用於檢驗市售產品之可行性，自行價購市售速食麵5件、調味飲料

5件、以薯(藷)類、麵粉或澱粉為原料之零食5件及口香糖5件，共計20件檢體，其檢體外包裝均未標示添加 β -環狀糊精，並依本檢驗方法進行檢體中 β -環狀糊精之測定，結果20件檢體均未檢出 β -環狀糊精。

結 論

本研究以液相層析串聯質譜儀分析食品中 β -環狀糊精，選擇速食麵、薯片、調味飲料及口香糖基質進行檢驗方法確效，檢驗方法之線性、準確度及重複性均良好且符合食藥署食品化學檢驗方法之確效規範，檢驗方法之定量極限，於速食麵、調味飲料及以薯(藷)類、麵粉或澱粉為原料之零食為0.1 g/kg，於口香糖及泡泡糖為0.5 g/kg。未來可應用於分析市售產品中 β -環狀糊精之含量，後續亦將規劃辦理檢驗方法公開程序，供各地方衛生局或民間實驗室參考使用。

參考文獻

1. Crumling, M.A., King, K.A. and Duncan, R.K. 2017. Cyclodextrins and iatrogenic hearing loss: new drugs with significant risk. *Front. Cell. Neurosci.* 11: 355.
2. Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J.C., Simal-Gandara, J. and *et al.* 2022. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chem.* 384: 132467.
3. 衛生福利部。2019。食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。108年06月11日衛授食字第1081300738號公告第二次預告修正。[<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=5072&id=25312>]。
4. Sforza, S., Galaverna, G., Corradini, R., Dossena, A. and *et al.* 2003. ESI-mass

- spectrometry analysis of unsubstituted and disubstituted- β -cyclodextrins: fragmentation mode and identification of the AB, AC, AD regioisomers. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14: 124-135.
5. Kinalekar, M.S., Kulkarni, S.R. and Vavia, P.R. 2000. Simultaneous determination of α , β and γ cyclodextrins by LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22: 661-666.
 6. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。110年11月01日公開修正。 [<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f637713826789525112&type=2&cid=38868>]。
 7. Ham, H.J., Sardar, S.W., Ishag, A.E.S.A., Choi, J.Y. and *et al.* 2022. Optimization of an analytical method for indoxacarb residues in fourteen medicinal herbs using GC- μ ECD, GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Separations* 9 (9): 232-243.
 8. Łozowicka, B., Rutkowska, E. and Jankowska, M. 2017. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (8): 7124-7138.

Development of Test Method for β -Cyclodextrin in Food

YU-JUN HONG, CHIAO-HSIN LIN, CHUN-JEN FANG,
YI-HSUAN CHAN, CHE-LUN HSU, YA-TZA LIN, SHOU-CHIEH HUANG,
SU-HSIANG TSENG AND DE-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

β -Cyclodextrin is a ring-shaped oligosaccharide composed of six glucopyranose. Its unique structure can enhance the stability, solubility, shelf life and color stability of guest molecules, and is widely used in foods, pharmaceuticals and biotechnology industries. An analytical method for determining β -cyclodextrin in food by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed in this study. The specificity, linearity, matrix effect, limit of quantification (LOQ), accuracy and repeatability were evaluated by spiking β -cyclodextrin into the instant noodles, potato chips, beverages and chewing gums. The results showed that the β -cyclodextrin had matrix interference in all samples, and the obtained matrix effect ranged from -25 to -64%, with a signal-inhibiting matrix effect. Its matrix-matched calibration curve has good linearity in the concentration range of 1-20 $\mu\text{g/mL}$. The average recoveries of β -cyclodextrin were between 90.3-103.5%, and the coefficients of variation were between 0.8-5.9%. The LOQs for β -cyclodextrin in instant noodles, snacks (potato, flour or starch as ingredients) and beverages were 0.1 g/kg, and those in chewing gum and bubble gum were 0.5 g/kg. This method was further applied to 20 commercial samples, and the results showed that β -cyclodextrin was not detected.

Key word: liquid chromatography/tandem mass spectrometry, β -cyclodextrin, instant noodles, potato chips, beverages, chewing gum